

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018580

International filing date: 13 December 2004 (13.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-436511
Filing date: 12 December 2003 (12.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

16.12.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年12月12日

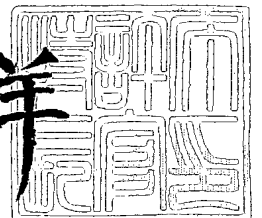
出願番号
Application Number: 特願2003-436511
[ST. 10/C]: [JP 2003-436511]

出願人
Applicant(s): 株式会社モレニウムラボラトリーズ

2005年 3月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川 洋



【書類名】 特許願
【提出日】 平成15年12月12日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 愛知県名古屋市天白区植田 1 丁目 1 2 0 7 番地
 【氏名】 小出 正文
【特許出願人】
 【識別番号】 501022930
 【住所又は居所】 愛知県日進市赤池町箕の手 2 丁目 1 5 7 8 番地
 【氏名又は名称】 モレニアム ラボラトリーズ
 【代表者】 中島 壽一郎
 【電話番号】 052-807-0390
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

* * *

【あて先】
【発明の数】 3 0

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

核酸、ペプチド、糖類、脂質、各種化学物質またはその断片からなるプローブを円盤もしくは円筒型支持体の円周面上に固定配置したものであることを特徴とする生物学的チップ。

【請求項 2】

請求項 1 において、前記支持体の素材がセラミックス、ガラス、結晶体、金属など無機質素材もしくは天然または合成高分子など有機質素材のいずれかまたはこれらの組み合わせからなる生物学的チップ。

【請求項 3】

請求項 1 において、核酸、ペプチド、糖類、脂質、各種化学物質の起源が微生物、リガンド、ヌクレオチド、抗体、抗原、蛋白質、ペプチド、炭水化物、多糖類、受容体、薬剤標的、植物あるいは動物細胞、細胞小器官、細菌、病原菌、抗生物質、薬剤、毒物、天然生成物、試験化合物及びこれらの断片からなる群から選択される対象物質に由来する生物学的チップ。

【請求項 4】

請求項 1 において、核酸、ペプチド、糖類、脂質、各種化学物質またはそれらの断片であるプローブの支持体への接着固定方法が印刷、描画、吹き付け、張り付け、巻き付け、吸着、各種化学反応または当該部位における合成であるところの生物学的チップ。

【請求項 5】

請求項 1 における円筒もしくは円盤がより厚い円筒もしくは円盤の薄切体である生物学的チップ

【請求項 6】

請求項 1 において、円盤もしくは円筒が積層構造により構成される円盤もしくは円筒である生物学的チップ

【請求項 7】

請求項 1 において、円盤もしくは円筒が、相違するプローブ群を設置した複数の円盤層もしくは円筒層の積層構造からなる、生物学的チップ

【請求項 8】

請求項 6 および 7 において、積層構造における層間にスペーサーを挟んで構成される円盤もしくは円筒である生物学的チップ

【請求項 9】

請求項 1 から 8 において、円筒もしくは円盤または円筒もしくは円盤を構成する構造体上に、プローブ配置部位指定マーキングが施され、部位指定マーキングから定められた位置にプローブが配置された生物学的チップ

【請求項 10】

請求項 1 から 9 において、円筒もしくは円盤または円筒もしくは円盤を構成する構造体上のプローブ群配置が、内部セクターで区切られた生物学的チップ

【請求項 11】

請求項 1 から 10 における円筒もしくは円盤または円筒もしくは円盤を構成する構造体のいずれかにおいて、各セクターまたはプローブのすくなくともどちらかの配置順序同定用のインデックスマーカーが設置された生物学的チップ

【請求項 12】

請求項 1 から 11 において、すくなくともひとつ毎のプローブ配置部位に標準値と初期値の検定用物質を設置した生物学的チップ

【請求項 13】

生物学的チップ上にあるプローブ群の検体溶液中への間歇的含浸をもたらすインキュベーター

【請求項 14】

請求項 1 から 12 における円筒もしくは円盤型生物学的チップ上プローブ群の検体溶液へ

の間歇的含浸をもたらすインキュベーションシステム

【請求項 1 5】

円筒もしくは円盤型生物学的チップの回転、または円筒もしくは円盤型生物学的チップ周辺に設置した計測系の移動により生物学的チップ上の反応を計測解析する機器

【請求項 1 6】

生物学的チップ上のプローブ設置部位に対面する円盤もしくは円筒様もしくは突起様構造体、または生物学的チップ上のプローブ設置部位に対面する円盤もしくは円筒様もしくは突起様構造体および前記円盤もしくは円筒様もしくは突起様構造体と生物学的チップとの間に介在する膜様もしくはフィルター様構造体とを用いた生物学的チップ上の反応の計測解析機器と計測方法

【請求項 1 7】

請求項 1 から 1 6 において、円筒もしくは円盤の構成支持体円周面上に配置されたプローブ群と検体間における生物学的もしくは物理化学的反應の結果を、光学的、電気的、化学的、物理的、または生物学的検出手段により解析する生物学的チップおよび計測解析機器

【請求項 1 8】

請求項 1 から 1 7 において、生物学的チップ上に配置されたプローブ群と検体間における生物学的もしくは物理化学的反應の結果を、プローブ固有の特性と照合して生物学的意義を検定導出する解析装置および連関解析法

【請求項 1 9】

請求項 1 から 1 8 において、複数の円筒もしくは円盤または複数の円筒もしくは円盤の構成支持体上に配置されたプローブ群と複数の検体に対する生物学的もしくは物理化学的反應または反應結果の計測解析を、平行して同時実施できる生物学的チップとインキュベーターおよび計測解析機器システム

【請求項 2 0】

円盤もしくは円筒様支持体の円周面に孵卵槽を配置したものであることを特徴とする生物学的チップ。

【請求項 2 1】

孵卵槽を配備した生物学的チップであって、各々の孵卵槽内に測定試薬を事前収納したものであることを特徴とする生物学的チップ。

【請求項 2 2】

測定試薬が事前収納された孵卵槽を配備した生物学的チップの孵卵槽であって、少なくともひとつの孵卵槽が、GOT、GPT、LDH、CPK、ALP、 γ GTP、LAP、BUN、CRE、Ch-E、Na、K、Cl、Ca、P、Fe、Mg、アンモニア、シアル酸、BS、HbA1C、アミラーゼ、ビリルビン、総蛋白、アルブミン、尿酸、コレステロール、中性脂肪、HDLコレステロール、LDL、CRP、ジゴキシン、テオフィリン、パルブロン酸、フェニトイン、甲状腺ホルモン、TSH、HBs抗原、HCV抗体、GH、LH、FSH、プロラクチン、ADH、ACTH、レニン活性、アルドステロン、ミオグロビン、ANP、BNP、エリスロポエチン、インスリン、PSA、CEA、CA19-9、AFP、各種遺伝子配列、各種遺伝子発現のいずれかの計測用であることを特徴とする生物学的チップ。

【請求項 2 3】

請求項 2 0、2 1、2 2 において、孵卵槽内溶液中に測定領域を設定する顕微測光方式および／またはコンフォーカル方式による吸光度計測機器および計測方法。

【請求項 2 4】

円盤もしくは円筒様支持体の円周面に孵卵槽を配置した生物学的チップであって、孵卵槽内に測定試薬の乾燥体を事前収納したことを特徴とする生物学的チップ。

【請求項 2 5】

請求項 2 0、2 1、2 2、2 3、2 4 において、着脱式孵卵槽を配置したものであることを特徴とする生物学的チップ。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 において、着脱式孵卵槽を配備した生物学的チップの孵卵槽の配置において、GOT、GPT、LDH、CPK、ALP、 γ GTP、LAP、BUN、CRE、Ch-E、Na、K、Cl、Ca、P、Fe、Mg、アンモニア、シアル酸、BS、HbA1C、アミラーゼ、ビリルビン、総蛋白、アルブミン、尿酸、コレステロール、中性脂肪、HDLコレステロール、LDL、CRP、ジゴキシシン、テオフィリン、パルブプロ酸、フェニトイン、甲状腺ホルモン、TSH、HBs抗原、HCV抗体、GH、LH、FSH、プロラクチン、ADH、ACTH、レニン活性、アルドステロン、ミオグロビン、ANP、BNP、エリスロポエチン、インスリン、PSA、CEA、CA19-9、AFP、各種遺伝子配列、各種遺伝子発現のうち、少なくともふたつ以上の項目の測定用孵卵槽を一体化したことを特徴とする生物学的チップ。

【請求項 2 7】

測定試薬が事前収納された着脱式孵卵槽を配備した生物学的チップの孵卵槽の配置において、少なくとも GOT、GPT、LDH、CPK、ALP、 γ GTP、LAP、BUN、CRE、Ch-E、Na、K、Cl、Ca、P、Fe、Mg、アンモニア、シアル酸、BS、HbA1C、アミラーゼ、ビリルビン、総蛋白、アルブミン、尿酸、コレステロール、中性脂肪、HDLコレステロール、LDL、CRP、ジゴキシシン、テオフィリン、パルブプロ酸、フェニトイン、甲状腺ホルモン、TSH、HBs抗原、HCV抗体、GH、LH、FSH、プロラクチン、ADH、ACTH、レニン活性、アルドステロン、ミオグロビン、ANP、BNP、エリスロポエチン、インスリン、PSA、CEA、CA19-9、AFP、各種遺伝子配列、各種遺伝子発現のすべてを含む計測項目のうちで、複数項目測定用の一体化着脱式孵卵槽の少なくとも二つ以上の組み合わせ配置により、多数の計測項目群の測定用孵卵槽を構成することを特徴とする生物学的チップ。

【請求項 2 8】

請求項 2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7 において、試薬またはサンプルを含む溶液の孵卵槽への注入をおこなう複数の試薬排出系を配置したものであることを特徴とする生物学的チップシステム。

【請求項 2 9】

請求項 2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8 において、サンプルの由来、計測日時、または解析項目のうち少なくともひとつをしめす読みとり可能なラベリングされた孵卵槽を配置したものであることを特徴とする生物学的チップ。

【請求項 3 0】

請求項 1 から 2 9 に示される生物学的チップの製造および構成装置

【書類名】明細書

【発明の名称】生物学的チップおよび生物学的チップ製造装置と読取解析装置システム。

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、生物学的、生化学的分子間反応を利用して、遺伝子型、遺伝子発現レベル、リガンドレセプター関係、酵素活性、生体内物質含量など多彩な生命現象の成因と発現様式を解明する素子およびその構成要素、およびこれらの製造と計測システムに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

医療やバイオテクノロジー分野において生物のゲノム、プロテオーム、トランスクリプトームなどの検討が活発になってきた。生命活動は単純な化学反応の組み合わせでは決して表現し尽くせない多彩かつ複雑な事象であるが、可能な限り生命現象の本質に近づくためには同時に多種大量の分子情報を獲得することが必須である。

【0 0 0 3】

よって、遺伝子の配列や発現を一括評価するためのDNA、プロテインチップを含む生物学的チップとこれらの計測系が実用化されている。

【0 0 0 4】

通常DNAチップは、DNAプローブの1つである所定の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを適当な間隔で、板状の基板にスポット状に固定化したものである。

【0 0 0 5】

支持体としては、ガラス基板、シリコン基板、プラスチック基板などが用いられている。これらのうちもっとも広く用いられているのは、顕微鏡用のスライドガラス支持体である。

【0 0 0 6】

一つのDNAチップ全体では、このようなスポットは $50\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ の間隔で平面上にマトリクス状に配列されている。各スポットに含まれるオリゴヌクレオチドは、スポット毎に互いに異なるヌクレオチド配列を有している。

【0 0 0 7】

支持体上にオリゴヌクレオチドを設置する方法としては、基板上で一塩基ずつ、オリゴヌクレオチドを伸長させながら固定化する方法と、あらかじめ別途合成しておいたオリゴヌクレオチドを基板上に固定化する方法がある。前者の代表的な技術は、フォトリソグラフィ技術であり、後者の方法にはメカニカルマイクロスポッティング技術がある。インクジェット技術はどちらの方法にも使用される。

【0 0 0 8】

フォトリソグラフィ技術は、(Fordor等、Science, 251号、767頁(1991年)参照)光反応性保護基を利用する。

【0 0 0 9】

まず、基板全面に前記保護基を有するアミノ基を固定化させておく。次に、所望の塩基を結合させたいスポットにのみ、通常の半導体製造プロセスで使用されるフォトリソグラフィ技術を使って、選択的に光照射を行う。ここに、同じ保護基を末端に有する所望の塩基を結合させる。そして、フォトマスクの形状を変更して、別のスポットに選択的に光照射を行う。このあと、同様にして、保護基を有する塩基を結合させる。この一塩基伸長させる工程を全スポットにおいて、所望の塩基配列が得られるまで繰返すことによって基盤上に異なるオリゴヌクレオチドが整列配置される。

【0 0 1 0】

一方、インクジェット法は、熱、圧電効果を利用し非常に小さい液滴を2次元平面の所定の位置に射出する技術である。DNAチップの製造では、液体チャンバーに接続された圧電素子に電圧を加えることにより、圧電素子の体積の変化によってチャンバー内の液体が接続されたキャピラリーから液滴となって射出される。射出される液滴の大きさは、キャピラリーの径、圧電素子の体積変化量、液体の物理的性質によって決定される。

【0011】

インクジェット装置を使ったDNAチップ製造装置は、インクジェット装置とDNAチップ基板とを相対運動させることにより、DNAチップ上の所望のスポットに所望の液滴を滴下することができる。インクジェット装置を使ったDNAチップ製造装置には、大きくわけて2種類ある。1つは1台のインクジェット装置を用いたDNAチップ製造装置であり、もう1つはマルチヘッドのインクジェット装置を用いた方式である。

【0012】

1台のインクジェット装置を用いたDNAチップ製造装置は、オリゴマー末端の保護基を除去する試薬を所望のスポットに滴下する構成になっている。所望の塩基を導入したいスポットの保護基を、このインクジェット装置を用いて除去して活性な状態にした後、DNAチップ全体に所望の塩基の結合反応操作を実施する。この際、インクジェット装置からの試薬の滴下によって、末端が活性化したオリゴマーを持つスポットのみに所望の塩基が結合する。この後、新たに付加した塩基の末端を保護する操作を行う。次に、保護基を除去するスポットを変更してこの操作を所望のヌクレオチド配列が得られるまで繰返す。

【0013】

マルチヘッドのインクジェット装置を用いたDNAチップ製造装置は、各塩基を含む試薬毎にインクジェット装置を用意することによって、各スポット毎に所望の塩基を直接結合させることができる構成になっており、前述した1台のインクジェット装置を用いたDNAチップ製造装置よりも高いスループットが得られる。

【0014】

あらかじめ合成したオリゴヌクレオチドを基板に固定化させる方法のうち、メカニカルマイクロスポッティング技術は、ステンレス製のピンの先端についたオリゴヌクレオチドを含む液体を機械的に基板上に押し付けて固定化していく技術である。マイクロスポッティング後には、UV光による固定化等の後処理が行われる。

【0015】

以上のようにして作製されたDNAチップを用いて、次のようにして検査対象の注目部位のヌクレオチド配列を計測する。

【0016】

前述のようにオリゴヌクレオチドプローブが固定化されたDNAチップにサンプルDNAやRNAを添加する。検体であるDNA、RNAは、あらかじめ増幅され、蛍光物質によるラベルが施されている。

【0017】

液相下において、サンプル中のDNA配列がDNAチップに固定化されたオリゴヌクレオチドの配列と相補関係（アデニンとチミン、シトシンとグアニン間の対応関係）にあると、検体中の塩基とチップ上の塩基間に水素結合による部分二重鎖、すなわちハイブリダイゼーションを生ずる。

【0018】

ハイブリダイゼーションの後、捕らえられなかったサンプル中のDNAを洗浄、除去する。これにより、サンプル中のDNAのうち、プローブオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するもののみがプローブ存在部位で蛍光を発生する。ラベリングには、蛍光物質の他に放射性同位元素を使用することもある。

【0019】

ハイブリダイゼーションの結果は、アレイリーダーにより、各プローブ存在領域の蛍光強度を測定して定量する。アレイリーダーの方式には、大きくわけて二種類あり、CCDカメラを使用して同時に複数スポットの蛍光強度を測定する方式と、コンフォーカルレーザ顕微鏡を使用して生物学的チップ上を2次元走査して測定する方式である。コンフォーカルレーザ顕微鏡の光検出器には、光電子倍增管や、アバランシェフォトダイオードが使用されている。

【0020】

照射した励起光の強度に較べて、検体にカップルした蛍光物質からの蛍光強度は有意に小

さいので、ダイクロイックミラーによる波長分離や、励起光と蛍光を空間的に分離するビームスプリッタが使用される。蛍光強度の測定は、強度の校正が不要なことから、2 波長以上で行われることが一般的である。CCDカメラを用いた方式では、励起光の光源にランプを使用し、広い面積を1度に励起する。コンフォーカルレーザ顕微鏡を使用する方式では、励起光の光源にレーザを使用し、集光したレーザスポットの内部のみを励起する。

【0 0 2 1】

従って、CCDカメラを用いた方式では、約1平方cm程度の広い領域を1度に測定できるのに対して、コンフォーカルレーザ顕微鏡を用いた方式では、1度に直径5～30 μ m程度の領域しか測定できない。また、コンフォーカル方式では、DNAチップまたは、顕微鏡ヘッドの2次元走査が必要となるため、読み取りのスループットが低下する。この2次元走査は、基板の載ったステージをXとYの2軸方向に走査することで実現する。典型的な走査時間は、20mm×60mmの領域を10 μ mの解像度でスキャンした場合で5～15分程度必要である。

【0 0 2 2】

一方、コンフォーカル方法では、蛍光発生深度の絞り込みによって、ノイズ光やフレアを取り除くことができ、CCD方式に比較して高いS/N比が得られる。

【0 0 2 3】

測定されたDNAチップ上の蛍光強度分布は16ビット程度の情報量を有する2次元の画像データとして出力される。この際、画像判定を容易にするために、擬似色付け処理が行われる場合もある。出力された画像内で蛍光強度が高いスポットは、検体中に該スポットのオリゴヌクレオチドの配列と相補的なcDNA配列が多く含まれていることを示す。したがって、どのスポットの蛍光強度が大きいかによって検体に多く発現した遺伝子群を調べたり、注目遺伝子のヌクレオチド配列を知ることができる。

【0 0 2 4】

プロテインチップとしては、レセプターとリガンド関係、抗原と抗体関係、酵素と基質関係、薬剤と作用点分子関係、など様々な様態への応用が試行されているが、二次元平面にプローブをならべたり、一次的にプローブを展開したものが多く、反応条件、計測手技の煩雑さや評価方法についても問題点がある。

【0 0 2 5】

血液生化学領域でのアッセイではオートサンプラーによるサンプルと試薬の混合とライン制御による搬送系と計測系のすべてを備える場合が多く、大容量の血液、高価で複雑な機材や多量の試薬を要し、大量の廃棄物を発生する問題がある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 2 6】

従来の生物学的チップでは主として平面上に展開されたマトリックス構造を形成し、基本的にシングルチップ毎を作成する手間をかけるため、チップ製造段階に多大な資源や作業を要している。また、同じ手順を踏む解析システムでも、高速で精度の高い計測が困難であった。本特許では大量かつ安価に生産可能であり、計測解析においても高性能でハイスループットな生物学的チップシステムを提供することを課題とする。また、各種血液検査にはオートアナライザーが用いられるが、機器が高価であり、故障も避けがたいうえに、試薬の使用量も大量である。従って、省経費と省資源の観点から、生物学的チップによるあらたな血液検査システムを創出することをさらなる課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0 0 2 7】

円盤もしくは円筒型支持体の円周面上に核酸、ペプチド、糖類、脂質、各種化学物質またはその断片からなるプローブを固定配置したことを特徴とする生物学的チップを構成し、この円盤もしくは円筒の回転により、円周面上に配列された複数のプローブ群から得られる計測情報を大量迅速に取り込むことによる。また、円盤もしくは円筒を数多くの薄板としたり、複数の薄板を積層することにより、大量のチップあるいは大容量チップを一括生

産することによる。血液検査にはチップ上に孵卵槽を並べた生物学的チップを構成することにより、システムの簡略化と小型化、省資源を実現することによる。

【0028】

円盤もしくは円筒状構造体の円周面上において円周と直交する方向にプローブを連続固定した後、続いて中心軸を中心として円筒もしくは円盤を一定の角度回転させ、再び円周面上において円周と直交する方向に次のプローブを連続固定してゆく。この作業を360度に達するまで反復して単一工程で広い領域にわたり多種類のプローブ固定をおこなう。

【0029】

事前に、円筒もしくは円盤を薄板積層構造としておけば、これをほぐせば、あるいは円筒もしくは円盤を薄切すれば、簡単に大量の同一チップを得ることができる。フォトリソグラフィによる場合も同様に、一種類の核塩基について円周に対して直交する方向に光保護基を除去し、定められた角度または距離分を回転して再び光処理する作業を円周を回周するまで繰り返した後、特定の塩基を結合すればよい。この場合、フォトマスクは直線状の一種類で済む。

【0030】

塩基についてはそれぞれ保護されたアデニン、グアニン、シトシン、チミンを溶液中に分散してある4種類の連続書き込み用ユニットを代わる々わるライン上にもちこんで描画すればよい。同様に、平面上でも作業する場合には、ロールに巻き込まれた短冊状または糸状の支持体を整列させて、短冊状または糸状の支持体に直交する方向にプローブを固定してゆき、既定の距離をずらしてからあらたなプローブを短冊状または糸状の支持体に直交する方向に固定する作業を繰り返す。最後に短冊または糸を分離して、一工程で多数のチップ構成パートを作成する。平面もしくは円筒上に多種類のプローブ配列を形成できる。さらには、円周に直交して特定の間隔を置いて、同時にいくつかのプローブを固定しつつ円盤を回転させる場合には作業の効率を一層高めることとなる。

【0031】

つぎに、多種類プローブが固定された円盤もしくは円筒を何種類か積層して大情報量の生物学的チップを構成する。プローブ固定部位の配置と順序の同定のためにはいくつかのラベリングを施し、積層の各層間における歪みやずれの修正のためにはいくつかの切れ目か凹凸による噛み合わせを設けることが好ましい。各層間に異種素材のスペーサーまたはメッキ、スパッター等によるコーティングを設置して、各層の分離、識別、絶縁等を容易にすることも好ましい。

【0032】

かくのごとく、円盤もしくは円筒の円周面上において縦横にプローブが規則的かつ精細に配置された生物学的チップが使用される時、様々な反応過程において、平面上でインキュベートする場合と比べ、円盤もしくは円筒の回転により少量のサンプルや液量で工程を賄うことが可能となる。

【0033】

また、計測においても、円筒もしくは円盤または円筒もしくは円盤を構成する多層薄板支持体上に配置されたプローブと検体との生物学的もしくは物理化学的反応の結果を、円筒もしくは円盤の回転、または円筒もしくは円盤の周辺に設置した計測器の移動により解析する生物学的チップおよび計測機器をシステム構成することにより、従来法に比べて単純簡略かつ精緻に測定系を成立する事が出来る。

【0034】

プローブと検体間における生物学的もしくは物理化学的反応の結果は、円筒もしくは円盤状生物学的チップの円周面上におけるプローブに対向するディテクションチップを対面する円盤または円筒の円周面上あるいは突起構造上に展開すればよい。さらには、両者間にフィルター膜を介在させて、光学的、電気的、化学的、物理的、または生物的検出手段により解析する生物学的チップおよび計測解析機器を構成すれば平面上と比べて精度と感度、操作の容易さの点で遙かに有用となる。

【0035】

少なくとも、反応結果の計測においても円盤もしくは円筒を軸を中心とした回転と上下運動のみで、シンプルな計測システムを構築できる。また、多数の検体となっても連続的に計測を継続することも可能となる。すなわち、積層構造においては各層のプロブ配置部位を一直線上に整列させてラインスキャン方式で高速にデータアクイジションも実行される。さらに、本特許の円盤もしくは円筒の円周面を用いる方式によれば、チップの回転と一直線移動の組み合わせのみで全プロブ領域のスキャンが高速かつ容易であるので、サンプルとプロブの結合前のプレスキャン、サンプル結合時のアッセイスキャン、サンプル剥脱後のポストスキャンを速やかに行って、真のプロブへのサンプル結合をより忠実に反映する測定値の獲得ができる。

【0036】

前記の方法論で獲得し、解析した各種反応結果は、単に限定された次元内の孤立情報として存在するのでは殆ど意義を発揮できない。プロブ群固有の特性と照合して生物学的意義を検定導出する解析装置およびソフトウェア、また複数のサンプル間での情報交換と連結して始めて、生命現象を理解して様々な介入手段を講ずる上で非常に重要な情報統合となる。すなわち、優秀な情報解析システムと連結することはシステムの全体価値をはるかに高めることになる。さらに、多数のサンプルを取り扱う場合には複数の平行処理を同時に実行することが時間的また資源的な経費削減と正確な相対評価のために有用である。

【0037】

生物学的チップにおいて、血液生化学検査、すなわち酵素活性など反応過程または結果の判定に精細な定量や濃度評価を要する場合には、単にチップを液中に浸すのみでなく、反応に関与する溶液の正確な液量と物質濃度の設定が要求される。ことにチップというスモールスケールの反応系の場合は僅かな誤差も大きな計測値変動に帰結する。従って、均一の形状の小容量の孵卵槽をチップの円周に規則的に配置することは、従来のオートサンプラー方式によるサンプルや反応液の注入よりも、極めて小さなシステム内で極少量のサンプルによって、正確かつ迅速な反応と結果検定するために有用である。このとき、反応計測システムを正確単純化するためには各種反応溶液を孵卵槽に事前収納しておくことが役立つ。一段階反応の場合は精細な微量がなされた各種反応溶液を孵卵槽にそれぞれ収納しておく。二段階反応を要する場合は隔壁を設けた二槽式の孵卵槽を設け、ひとつの孵卵槽にて第一反応を実施した後、隔壁を破壊して第二反応をすすめるか、二段目の試薬を収納した易破壊性収納器を破裂させてもよいし、インクジェット方式やマイクロピペット方式などで第二試薬を投入しても良い。少量の液体を混和するためにはバイブレーターや音波などによる振動や遠心回転が役立つ。チップシステムにおいて吸光度法による計測の場合は透光性素材からなる孵卵槽壁を透かして計測しても良いし、ミニサンプラーで採取した反応液の吸光度をキュベット内等で計測しても良いし、吸光度を計測するマイクロプロブを反応液中へ挿入しても良い。計測部位を確実に溶液中に求められるコンフォーカル法も好ましい。

【0038】

生物学的チップにおいて、反応試薬などとサンプルを液層にて反応させる必要があるが、液体の試薬は保存中に蒸発したり、経時的に活性が低下することが問題となる。ここで、凍結乾燥などにより、当初より孵卵槽に固層の必要試薬を投入してあれば、単にサンプルあるいはその希釈液を加えるのみで、正確な量と活性を維持して反応が進行する。二段階反応の場合は隔壁を設けて第二反応開始時に隔壁を破いたり、浸透圧などで破裂する第二液の収納部を設ける、またはインクジェット方式やマイクロピペット方式などで第二試薬を投入しても良い。

【0039】

各種医学生物学的アッセイにおいて、解析項目は多種類のなかから選択することが多い。この場合、多種類の異なる反応を行う孵卵槽を用意して着脱式孵卵槽の組み合わせにより解析項目を選択すれば、無分別に項目を選ぶ時と違い、不必要なサプライ消費を防止できるし、計測の無駄も省けることになる。また、電解質、肝機能、腎機能、心筋傷害、などに特有の解析項目をまとめて孵卵槽ブロックにしておき、これを数種類組みあわせて全解

析項目を構成するのも便利である。

【0040】

生物学的チップにおいて着脱式孵卵槽を装着した場合、孵卵槽に自身を表示する機能がなければ、どの槽が何の項目を計測しているのか認知することが困難となる。ここで、サンプルの由来と解析項目、検査日時などを孵卵槽にラベル表示しておけば、複数の人物の異なる種類の解析項目を同時に平行計測することが可能となる。

【0041】

また、円盤もしくは円筒の円周面上にプローブを配置した生物学的チップにおいては、各種プローブ固定部位が円盤もしくは円筒の回転方向に沿って円周面上に等間隔に区画分けされ、各区画毎に互いに異なるプローブ種同定用マークを設け、さらに、プローブ固定部位には円盤もしくは円筒の回転方向に沿って、プローブ存在部位を呈示するマークが設ければ、上記プローブ種とマーキング位置の読みとり認識によつて的確なシグナル計測部位を事前決定できるので、計測精度の向上のみでなく、連続計測の確度とスピードを飛躍的に向上できる。

【0042】

さらに、積層された円筒もしくは円盤構造については層間を認識できる標識また各層を区分する異素材の挿入を施し、プローブ固定領域を前記標識に沿って配置構成しておけば、円周面上の縦横に規則的かつ精細な配置構成がもたらされる。

【0043】

また、反射表面を呈する積層型円筒もしくは円盤の円周面表面に形成されているサンプル部位指定マークと層間マークと、前記円周面の表面に積層されている透明部材と、該透明部材の表面にDNAプローブが固定化されている複数の計測部位とを有し、計測部位は、前記層間マークとインデックスマークに沿って配列、且つ配列の連結方向に対して区画分けされ、前記インデックスマークは前記区画毎に形成されていて、前記区画毎に互いに異なり、且つ読み取り可能に記録されていることを特徴とする生物学的チップを構成すれば、光学的スキャンに役立つ。

【0044】

次に、円筒もしくは円盤構造体の円周面表面にプローブが固定された生物学的チップを回転させることによって前記プローブ固定部位の走査を行うことを特徴とする生物学的チップ読み取り装置を提供する。好ましくは、円筒もしくは円盤構造体の円周面表面にプローブが固定された生物学的チップを回転させることによってプローブ固定部位の走査を行い、プローブ固定部位の走査の際にトラッキングマークに追従するトラッキングサーボ機能を有し、且つプローブ固定部位走査の際にインデックスマークに従ってプローブ固定部位を独立に読み取ることを特徴とする生物学的チップ読み取り装置を提供する。さらに、生物学的チップの回転に伴う、読み取りヘッドと前記生物学的チップの板体との距離変動に追従するフォーカシングサーボ機構を備える。

【0045】

また、円筒もしくは円盤構造体の円周面表面にプローブが固定された生物学的チップを固定し、回転させる回転機構および回転軸に平行してチップ位置を変化させる移動機構と、光源と、該光源から出射される光を生物学的チップに照射する照射光学系と、生物学的チップ上に照射する光源と生物学的チップとの相対的な位置を変化させる移動装置と、生物学的チップからの反射光を検出する反射光検出光学系と、生物学的チップのプローブ固定部位からの蛍光を検出する蛍光検出光学系と、制御装置とを有し、反射光検出光学系は、生物学的チップに形成されているプローブ設置部位表示マークに基づき制御装置によるトラッキングサーボ機能と、生物学的チップに形成されているインデックスマークに基づき制御装置によりインデックスの読み出しを行う機能とを有し、蛍光検出光学系は、光検出器と、該光検出器へ蛍光を選択的に通過させるアパチャーとを有し、光検出器からの信号が制御装置に入力し、プローブ部位走査の際にインデックスマークに従って特定のプローブ存在部位からの情報を独立に読み取ることを特徴とする生物学的チップ読み取り装置を提供する。また、反射光検出光学系は、生物学的チップの回転に伴う生物学的チップの表

面の変動に追従するフォーカシングサーボ機能を更に有することを特徴とする生物学的チップ読み取り装置を提供する。

【0046】

いっぽう、円盤型もしくは円筒型チップに対面する読みとり用ドラムを配置してチップとともに回転させるとき、チップとの接触面を特異的プローブ領域に限定してデータ計測することにより、プローブから得られる情報の感度、精度の向上、バックグラウンドの低下を実現した計測を行う。このとき、チップと読みとり用ドラムとの接触面にはフィルター膜構造を介在させたり、フィルター自体を計測用媒体とできる。チップ側、フィルターまた対面するドラム側素材の構成成分として、カーボンナノチューブ、有機発光物質、金属質粉や膜、などの物質独特の性質が顕著な、感光媒体、導電成分、発光基質、接着成分、絶縁成分、などを採用すれば、光学的、電気的、物理的、化学的、生物学的等の検出手段によって、容易に感度よくプローブ領域からの計測情報を収集できる。

【0047】

チップと読みとり用ドラム、またはチップと介在膜と読みとり用ドラムは接触した状態とし、いずれかを回転もしくはスクロールすることにより円周面からの情報を円周方向に沿って順次収集できる。すべり防止のためには、柔構造をくみあわせることが役立つ。

【発明の効果】

【0048】

本発明による生物学的チップのなかで、DNAチップ、及びDNAチップ読み取り装置によれば、多くの遺伝子群の多数のドメインについてのプローブを積層された幾種類かの構成薄板上に分割して網羅できるので、すべての遺伝子群のうち関心のあるグループをカバーするように構成薄板を選択して組み合わせることによりオーダーメイドのチップを大量かつ安価に作製したり、逆に未知の事象に関しては無作為に大量の遺伝子群のスクリーニングもできる、応用性に富んだチップ作製と解析方式が実現できる。また、軸ぶれの無い円盤回転とチップの直線運動の組み合わせにより、コンフォーカル顕微鏡などによる高いS/N比の確保のうえで、高速にチップを走査することも可能である。加えて、円周面表面は液中に常時含浸されることは必須でなく、孵卵中のサンプル溶液とプローブとの接触は間欠的でありながら安定均一であるので、少量のサンプル溶液でも良好なハイブリダイゼーションにより正確な検討が可能となる。一方、血液生化学用のチップでは、従来よりも遙かにコンパクトで経費節減と廃棄物減少に役立つ検査法が確立される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0049】

以下に、本発明による実施の形態を説明するが、本発明はこれらに限られるものではない。

【0050】

図1は本発明の第1の実施の形態の生物学的チップを示す概略構成図である。

【0051】

生物学的チップは、直径2cmの円盤状であり、中心に回転用のスピンドルに固定されるための穴3が空いている。この第1の実施形態の核酸用生物学的チップをDNAチップとする。円盤は厚さ約5mmのポリカーボネート製である。ポリカーボネート製の円盤の円周面上部には、インデックスマークのピット1及び下部には塗装によるトラッキングマーク2が形成され、プローブは直線状領域4に固定されている。

【0052】

円盤の円周面表面に反射膜である厚さ500nmのアルミ反射層が蒸着されている。これにより、円盤の円周面表面は、反射面になっている。トラッキングマークのピッチは20 μ mであり、インデックスマークの段差は、インデックスの読み出しに使用する光源の波長の約1/4である。アルミ反射層の上には、透明部材であるガラスの層が50 μ mの厚さで積層されている。第1の実施の形態のDNAチップではガラスの層の材料はホウ珪酸ガラスであり、スパッタにより成膜されている。

【0053】

ガラスの層の表面には、トラッキングマークに沿って一定の配置部位にDNAプローブが固定化されている複数の領域4が円周上で等間隔に配列されている。1つの区画にはインデックスマークと96個のプローブ固定領域とが配置されている。このように、領域は配列の列方向に区画分けされ、各区画毎に割り振られたインデックスマークを有している。

【0054】

また、第1の実施形態のDNAチップでは、基板を円盤状としたが、円盤形状の中抜きされた筒状等であってもよい。ここで、インデックスマークのピット及びトラッキングマークが圧縮成形、塗装により形成されているとしたが、射出成形や2P法等により形成されてもよい。また、第1の実施形態では円盤の円周面表面の上にアルミ反射層は蒸着により成膜されているが、スパッタ等により成膜してもよい。また、円盤の素材はポリ塩化ビニルやアクリル等の樹脂、ガラス、アルミ等の金属、Si、多孔質セラミックス等であってもよい。円盤がアルミやSi等の高反射率の材料である場合は円盤の表面に反射膜を成膜しなくてもよい。この場合、インデックスマークのピット及びトラッキングマークは、圧縮成形やエッチングや切削加工等により形成される。また、第1の実施形態のDNAチップでは、透明部材のホウ珪酸ガラスをスパッタで成膜しているが、真空蒸着やCVD等により成膜してもよい。

【0055】

また、第1の実施形態のDNAチップでは、円盤の円周面上反射面の上に透明部材として、ホウ珪酸ガラスを用いているが、石英ガラスやパイレックスガラス等の他のガラスでもよいし、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニル、アクリル等の透明な樹脂でもよい。基板にSiを用いた場合には、Si基板の表面にエッチング等によりトラッキングマーク及びインデックスマークを形成した後に、Si基板を熱酸化することによりSiO₂膜を形成して透明部材として用いてもよい。さらに、多孔質素材を用いてDNA固定とハイブリダイゼーションの効率を改善しても良いし、カーボンナノチューブ、金薄膜などで表面処理して、電気的、物理的計測に対応しても良い。また、同一区画内プローブ固定領域は96個以外の個数であってもよい。

【0056】

第二の実施形態では、厚さ1mmの薄い円盤もしくは円筒を積み重ねて多数の同一チップを作製する場合の模式図をしめす(図2)。第一の実施形態と同様に、薄い直径2cmの円盤の円周面表面に反射膜である厚さ500nmのアルミ反射層が蒸着されている。これにより、円盤の円周面表面は、反射面になっている。トラッキングマーク5のピッチは20μmであり、インデックスマーク6の段差は、インデックスの読み出しに使用する光源の波長の約1/4である。アルミ反射層の上には、透明部材であるガラスの層が50μmの厚さで積層されている。100枚の前記円盤を、インデックスマークの整合下において、中心軸7に合わせて次々に重ねていく。

【0057】

前記作業の終了後、各々のインデックスマークに対応するプローブ群を中心軸7に平行して円周面上領域8に連続プリント固定して行く。引き続き、円盤を0.6度だけ左回転させて他のプローブを連続プリント固定する。このプローブ連続固定と円盤の回転を600回繰り返す。この時、およそ105μm間隔でプローブが配列される。プリント描画の太さを20μmとすると、ひとつのプローブあたり0.02mm²の面積でプローブが固定される。プローブ固定後の円盤を中心軸から順次とりはずして円周面上の360度にわたり600種類のプローブを固定された、100枚の同一ロットのDNAチップを得る。各層の間にスペーサーを挟んでおくと一層毎を取り外しやすい。

【0058】

さらには、第三の実施形態では、円周に直交して特定の間隔を置いて、同時にいくつかのプローブを固定しつつ円盤を回転させる場合には作業の効率を一層高めることとなる(図3)。すなわち、円盤の中心軸と平行な直線運動9と、円盤軸を中心とする回転運動10とを同期させて、多層の全層における全てのプローブ群とインデックスマークの配置関係を一定とするように、複種類のプローブを同時に固定することが出来る。例えば、10

基のプリンターヘッドを備え、一度に10種類のプローブを固定して行くときプローブ溶液のみを代えて用意すれば単一プリンターヘッドで600回のプリント工程作業が必要なものに比べ60回の作業で済み、多大な作業時間の短縮がもたらされる。

【0059】

次には、例えば600種類毎の相異なるプローブ群が固定された20枚の円盤DNAチップを作製する。前記20種類の薄い円盤を順次中心軸に合わせて積み重ねる。ここで、材質の異なる柔軟なスペーサーを層間に介在させると各層の隙間を密着させつつプローブの固定された円盤を保護する効果、さらにプローブ固定部位の識別性向上に有用となる。例えば、厚さ1mmの円盤を0.1mmの薄いスペーサーを挟んで積み重ねて、21.9mmの厚さを持った直径1cmのサイズで12,000種類のプローブを載せた厚い円盤の形態を呈するDNAチップ（図2様）が完成する。

【0060】

第四の実施形態では、図2のDNAチップとサンプルとのハイブリダイゼーションを行う容器をしめす。直径1cm、厚さ21.9mmの多層円盤チップ11を中心軸12を横向きに倒して、図4のごとく、底面が湾曲した容器13のなかに配置する。円盤チップと容器の間には僅かな間隙を与えて、ここにサンプル溶液14を200 μ l注入する。円盤を中心軸12を中心として回転しつつ孵卵すると、プローブとサンプル間において、安定して確実なハイブリダイゼーションがもたらされる。サンプルとプローブとの充分な結合が得られた時点で、DNAチップを孵卵容器から取り出して洗浄後、結合したサンプル量を定量する。

【0061】

すなわち、オリゴヌクレオチドプローブが固定化された円盤型DNAチップを回転しながら、蛍光色素マーキングを施したDNAを含む溶液とともに孵卵する。この後、DNAチップを回転しつつ洗浄する。次にDNAチップ読み取り装置にDNAチップを固定する。スピンドル及びサーボモーターによりDNAチップを固定し、円盤軸を中心として回転させる機構と一軸運動により多層に分布するプローブ領域をスキャンできる仕組みを備える。

【0062】

DNAチップ読み取り装置の光学系は、光源、受光素子、光学素子が一体化しており、一体化した光学系は、DNAチップの円周面上の一カ所において円盤軸に平行して移動できる構成になっている。つまり、DNAチップ読み取り装置はDNAチップ上に照射される光とDNAチップとの相対的な位置を円周面に直交して移動させる駆動装置を有している。光源から出射した光は、コリメータレンズ、ハーフミラーを透過し、ミラーにて反射され、レンズによって集光されてDNAチップのアルミ反射面に照射される。アルミ面からの反射光は、レンズ、ミラーを通過してハーフミラーによってトラッキング／インデックス検出光学系に導入される。

【0063】

トラッキング／インデックス検出光学系は、通常の情報記録層である円盤チップのトラッキングサーボ機構に使用されているプッシュプル法、ウオブル法、3ビーム法等のいずれかにより、DNAチップのアルミ反射面に照射される光がトラッキングマークに追従するようにトラッキングサーボを行う。従って、DNAチップの中心に形成されている中心軸がDNAチップの中心から偏心していたり、DNAチップの円周面に凹凸があったとしても、トラッキング／インデックス検出光学系からの信号により一体化した光学系の位置を制御することにより、プローブが固定されている位置から照射光がずれることがない。

【0064】

また、トラッキング／インデックス検出光学系は、インデックスマークを読み取り、DNAチップ上の位置座標を表す信号を出力する。前述したようにインデックスマークは光源の波長の1/4の段差を有しているので、光源からの光がインデックスマークの段差の上の部分で反射する光と底の部分で反射する光の光路差が光源の波長の1/2となるため、全反射光の強度は、インデックスマークのエッジ部分以外に照射されている場合の全反射

光の強度に比べて小さくなる。そして、前述したように各区画毎のインデックスマークは互いに異なっているので、各インデックスマーク毎の反射光の強度変化を位置座標を表す信号として利用できる。つまり、光源の波長の $1/4$ の段差を有しているインデックスマークは、読み取り可能に記録されている。

【0065】

DNAチップが移動して、ミラーで反射した光がDNAチップの円周面表面のDNAプローブが固定化されている領域に照射され、且つ、当該領域内にハイブリダイゼーションが生じていると、照射された光によってDNAチップのプローブ固定領域表面で蛍光が生じる。生じた蛍光は、レンズによって集められ、ミラーによって反射した後、レンズによってアパチャーに集光される。アパチャーの開口部の寸法及び位置は、DNAチップの表面からの蛍光が選択的に通過するように設定しており、通常のコフォーカル顕微鏡型の検出方法と同様の構成になっている。従ってアルミ反射面光や、コンタミネーション光や途中の光学系からのフレア等のノイズ光は、アパチャーで効率よく遮断されることになる。そして、アパチャーを通過した蛍光は光検出器によって検出される。円周上の特定部位における最上層の計測領域で蛍光の検出を終えると、順次DNAチップである円盤を上方に押し上げて、位置決めと計測を順次行っていくと、最終の20番目のプローブ位置に到達する。

【0066】

演算装置は、トラッキング／インデックス検出光学系からの位置情報と、光検出器からの出力を基にプローブ領域の位置とプローブ番号、ハイブリダイゼーションの蛍光強度を対応させて出力する。

【0067】

演算装置にはDNAチップ上の各領域にあるDNAプローブのヌクレオチド配列のもととなる遺伝子名や機能に関するデータが記憶して、このデータと以上の読み取り結果との関から検体DNAの特徴を推定出力することができる。

【0068】

ハイブリダイゼーション後の蛍光マーカーの検出に、コフォーカル顕微鏡法を使用するとき、高いS/N比と検出感度が向上を達成することができる。更に、DNAチップの走査には、DNAチップの回転および一軸運動と、光学系の固定化とを、もしくはDNAチップの回転と光学系の一軸運動とを組み合わせることで、X方向とY方向の2軸ステージ走査に較べて、明らかに走査速度を向上させ、チップの読み取り時間を短縮させることができる。

【0069】

また、例えば、プローブ領域からの信号強度が小さく、積算測定によってS/N比を向上させようとする場合、全ての走査を繰返すことなく、特に注目している少数のプローブ領域のみについて走査を繰返すような読み取り方法を実施できる。

【0070】

複数の波長における読み取りが必要である場合には、単に光源、受光素子等を増設した構成とすればよい。

【0071】

なお、回転に伴いDNAチップの円周面表面が変動してもレンズとDNAチップの円周表面との間隔を一定に保つフォーカシングサーボ機構を有することが好ましい。これによりDNAチップが歪んでいて、回転に伴いDNAチップの円周表面が変動する場合でも、蛍光を正確に検出することが可能となる。DNAチップの表面とレンズとの間隔を求める方法としては、非点収差法、フーコー法、ナイフエッジ法、SSD法等を用いればよい。

【0072】

ここで、フォトリソグラフィーにより生物学的チップであるDNAチップを作製する場合の詳細を示す。

【0073】

位置検出用光源であるトラッキング／インデックス用光源から出射した光は、コリメータ

レンズ、ハーフミラーを透過し、ハーフミラーにて反射され、レンズによって集光されて DNA チップ上のアルミ反射面に照射される。コリメータレンズ、ハーフミラー、レンズが位置検出用光源から出射される光を円盤の円周面に照射する照射光学系を構成する。

【0074】

アルミ反射面からの反射光は、レンズ、ハーフミラーを通してハーフミラーによってトラッキング／インデックス検出光学系に導入される。トラッキング／インデックス検出光学系は、DNA チップ読み取り装置と同様の方法でトラッキングサーボを行い、インデックスマークを読み取り、DNA チップ上の位置座標を出力する。

【0075】

制御装置は、トラッキング／インデックス検出光学系からの位置情報に基づき、光反応性保護基除去用光源のオン／オフを制御する。DNA チップ製造装置の光学系は、光源、受光素子、光学素子が一体化しており、光学系は DNA チップの円周面上の任意の位置に移動できる構成になっている。つまり、DNA チップ製造装置は DNA チップの円周面を照射する光源と DNA チップとの相対的な位置を移動させる駆動装置を有する。

【0076】

DNA チップでは、ガラス表面全体にシランカップリング剤を用いてアミノ基が導入されており、従来のフォトリソグラフィ技術による DNA プローブの合成技術で使用されたものと同様の機能を有する光反応性保護基が結合されている。DNA チップはスピンドルに固定され、一軸運動と回転運動により動作制御される。

【0077】

トラッキング／インデックス検出光学系を用いて、DNA チップの円周面上の座標を検出し、所望のヌクレオチドを結合させたい領域が光照射範囲の直下に来たときに、光反応性保護基除去用の光源をオンにする。光源を出た光は、レンズを透過し、当該スポットの光反応性保護基を除去する。ここで、中心軸に平行で円周面に直交する方向に DNA チップを移動すると、円周面上で直線状に光反応性保護基の除去領域が形成される。これを特定の塩基を導入したい領域に関して繰り返す。円盤もしくは円筒の全周にわたって処理を終えた後、結合させたいヌクレオチドの含まれた溶液を投入する。この結果、光反応性保護基が除去された直線領域群にのみ所定のヌクレオチドが結合する。この工程を A、G、T、C のヌクレオチドについてそれぞれ 1 回毎実行する。前記一連の作業を、所望のヌクレオチド配列が得られるまで繰り返すことにより、DNA チップの全領域に DNA プローブを固定化できる。一般には、事前にプログラムに入力された複数の核酸プローブ配列のうち、まずそれぞれのプローブの第一塩基につき、A、G、T、C、の 4 種類それぞれについて、円周面全周にわたるそれぞれのプローブ固定領域について DNA チップを回転させては、予定領域における光保護基の除去を行い、一周させた後、ヌクレオチド結合をおこなう。すなわち光照射とヌクレオチド結合の工程を計四回繰り返すと全周にわたる一塩基の伸長がもたらされる。

【0078】

なお、本実施形態においては、光反応を用いてオリゴヌクレオチドを DNA チップ円周表面に固定化したが、トラッキング用光照射領域と既知の位置関係にあるインクジェット装置や、描画機構を用いてプローブを固定化してもよい。

【0079】

また、本実施形態においては、回転に伴い DNA チップの円周面表面が変動してもレンズと DNA チップの円周面との間隔を一定に保つフォーカシングサーボ機構を有することが好ましい。これにより DNA チップの表面が歪んでいて、回転に伴い DNA チップの表面が変動する場合でも、DNA プローブを固定化することが可能となる。DNA チップ表面とレンズとの間隔を求める方法としては、非点収差法、フーコー法、ナイフエッジ法、S S D 法等を用いればよい。

【0080】

いっぽう、臨床血液生化学検査装置システムにおいては、GOT、GPT、LDH、CPK、ALP、 γ GTP、LAP、BUN、CRE、Ch-E、Na、K、Cl、Ca、P

、Fe、Mg、アンモニア、シアル酸、BS、HbA1C、アミラーゼ、ビリルビン、総蛋白、アルブミン、尿酸、コレステロール、中性脂肪、HDLコレステロール、LDL、CRP、リパーゼ、各種免疫学的計測項目などのうち、30種類の計測第一試薬をそれぞれに指定されたインクジェットプリンターの貯留槽に充填しておく。各サンプルについて事前に指定された計測項目に必要な試薬類を、1種類ずつそれぞれの計測項目に対応する孵卵槽22の順列をインデックス21に従って記憶しつつ、インクジェット方式により孵卵槽に放出する。一度放出する度に生物学的チップ図5を中心軸24を中心として10度ずつ回転して次の試薬の放出されるプリンターヘッドの位置に移動させ、次の計測項目用試薬を次順の孵卵槽へ放出する作業をくりかえす。必要な項目全ての試薬が充填されたら、空の孵卵槽は放置したまま、チップを10度ずつ回転しながら次々に試薬の充填された孵卵槽へサンプル血漿を投入する。サンプル投入量の誤差を修正するためには、全体のサンプルに滴定用マーカー物質を加えて、サンプル希釈時のマーカー濃度からアッセイに用いたサンプル量が補正する。この後、加速度的回転などによる十分なミキシングを経て適当な時間の孵卵を終える。必要に応じて、第二試薬を、第一試薬に準ずる方法で孵卵槽へ投入して、混和、孵卵する。充分な発色が達成されたら、このチップは計測系へと移動され、10度ずつ回転させながら、各孵卵槽における吸光度を計測して先に記憶済みの孵卵槽の順列とサンプルの由来を参照しつつ、標準曲線にのせて各計測項目の測定値を算出する。最後に患者ファイルへのデータ保存とプリンターによるデータ打ち出しを行って作業を終了する。

【0081】

事前に試薬が収納された着脱式のマイクロ孵卵槽22を使用する場合は、各計測項目に対応する30種類の孵卵槽が納められたシェルフから、プログラムに入力された項目ごとの孵卵槽を取り出して待ち行列23を形成してから、チップの円周上にはめ込み配列させる。ここで、サンプル血漿またはその希釈液を孵卵槽内22へインクジェットにより投入し恒温槽にて反応させる。第二試薬が必要なものは第二試薬の追加を経て孵卵槽内に産出された吸光物質の濃度を計測して測定値を算出する。各サンプルデータは集計され、患者情報とともに集中管理および出力される。

【0082】

図5の如く均一な形状の小容量の孵卵槽22をチップの円周に規則的に配置することは、従来のオートサンプラー方式によるサンプルや反応液の注入よりも、極めて小さなシステム内で極少量のサンプルによって、正確かつ迅速な反応と結果検定するために有用である。一段階反応の場合は各種反応溶液を孵卵槽にそれぞれ収納しておく。二段階反応を要する場合は隔壁を設けた二槽式の孵卵槽の隔壁を破壊して反応をすすめるか、二段目の試薬を収納した易破壊性収納器を破裂させてもよいし、インクジェット方式やマイクロピペットなどで二段階目の試薬を投入しても良い。少量の液体を混和するためにはバイブレーターや音波などによる振動や遠心回転が役立つ。チップシステムにおいて吸光度法による計測の場合は透光性素材からなる孵卵槽壁を透かして計測しても良いし、ミニサンプラーで採取した反応液の吸光度をキュベット内等で計測しても良い。また、吸光度を計測するマイクロプローブを孵卵槽内へ挿入しても良い。微小液量の局所からの吸光度を正確に検定するためには、顕微測光、コンフォーカル方式やスペクトル解析を採用することが適切である。

【0083】

生物学的チップにおいて、反応試薬などとサンプルを液層にて孵卵する必要があるが、液体の試薬は蒸発したり、活性が低下することが問題となる。ここで、凍結乾燥などにより、当初より孵卵槽に固層の必要試薬を投入してあれば、単にサンプルあるいはその希釈液を加えるのみで、正確な量と活性を維持して反応が進行する。この時も少量の液体を粉体と混和するためにはバイブレーターや音波などによる振動や遠心回転が役立つ。二段階反応の場合は第一反応終了時に第二反応液を加えてもよいし、隔壁を設けて第二反応開始時に隔壁を破いたり、浸透圧、加圧などで破裂する第二液の収納部を設けることが好ましい。

【0084】

図6のように、プローブ結合後の計測にあたり、円盤型DNAチップ31に対向する読み取り用円盤32と介在する膜33を用意するとき、プローブと計測用センサーは円周上の一直線でのみ、接線を形成することになり、円盤の回転方式やフィルター膜33のスクロールにより、プローブ固定部位からの特異的サンプリングが可能となる。

【0085】

図7のように、カーボンナノチューブで表面処理された後にプローブ35を固定した多層円盤チップ34をサンプルとハイブリダイズ後、精細に導電配線38された読み取り用円盤37と有機発光素材をインターカレートした膜フィルター36を挟んで対向させる。導電配線38から円盤チップ34にパルス電位を負荷すると、ハイブリダイズしたプローブ側からカーボンナノチューブを経て効率よく電子流が流れ込み、膜フィルター36を発光させる。この結果、読み取りユニット37に組み込まれたCCD素子に電荷が蓄えられてプローブに結合したDNAが計測される。

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】円周面上にプローブが固定された円盤型生物学的チップ

【図2】複層構造の、円周面上にプローブが固定された円盤型生物学的チップ

【図3】同時に複数のプローブが設置される、複層構造の、円周面上にプローブが固定された円盤型生物学的チップ

【図4】円周面上にプローブが固定された円盤型生物学的チップのインキュベーションの様子

【図5】円周面上に孵卵槽が設置された血液生化学用の円盤型生物学的チップと孵卵槽の待ち行列

【図6】円周面上にプローブが固定された円盤型生物学的チップとチップに対面する円盤型読み取りシステム

【図7】円周面上にプローブが固定された多層構造の円盤型生物学的チップとチップに対面する円盤型読み取りシステム

【符号の説明】

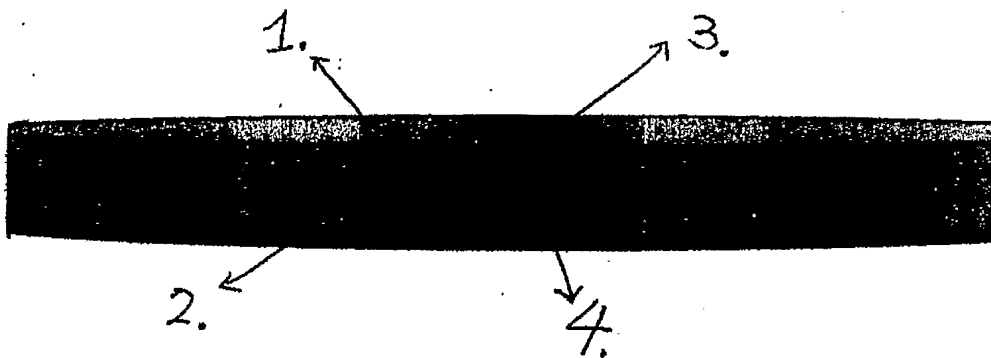
【0087】

- 1 チップ上インデックスマークのピット
- 2 チップ上トラッキングマーク
- 3 回転用スピンドル
- 4 プローブ固定領域
- 5 トラッキングマーク
- 6 インデックスマーク
- 7 中心軸
- 8 プローブ固定領域
- 9 中心軸と平行移動
- 10 中心軸に対する回転運動
- 11 多層円盤チップ
- 12 中心軸
- 21 インデックスマーク
- 22 孵卵槽
- 23 待ち行列
- 24 中心軸
- 31 円盤型チップ
- 32 読み取り用円筒
- 33 フィルター膜
- 34 多層円盤型チップ
- 35 プローブ

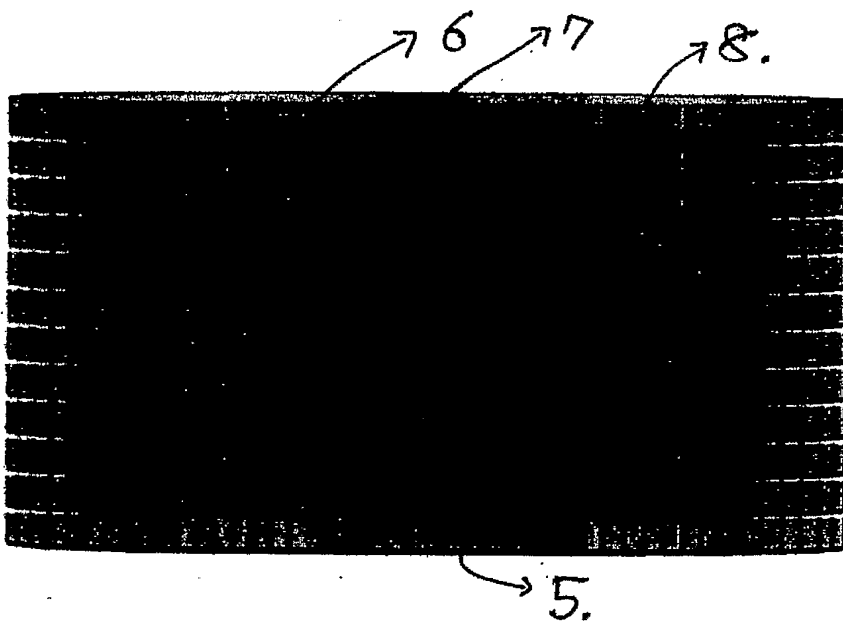


- 3 6 フィルター膜
- 3 7 読み取り用円筒
- 3 8 導電配線

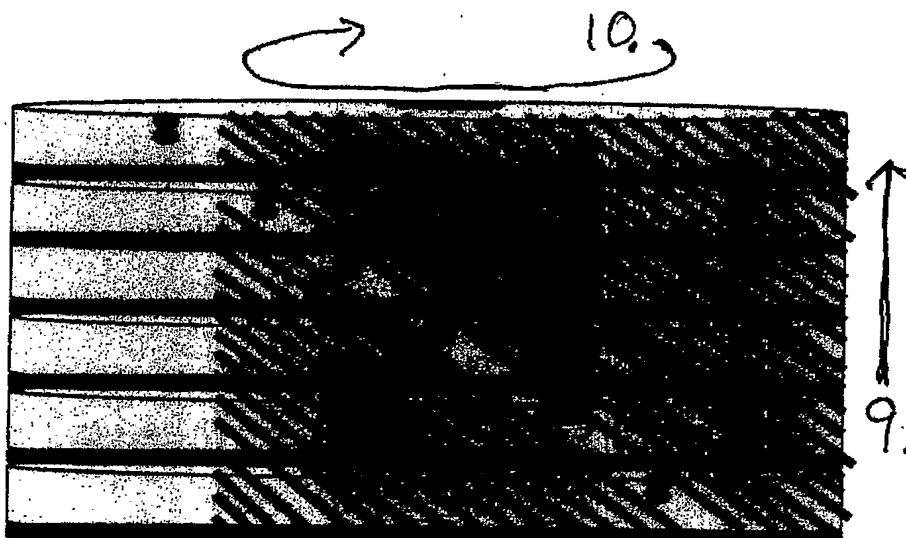
【書類名】 図面
【図 1】



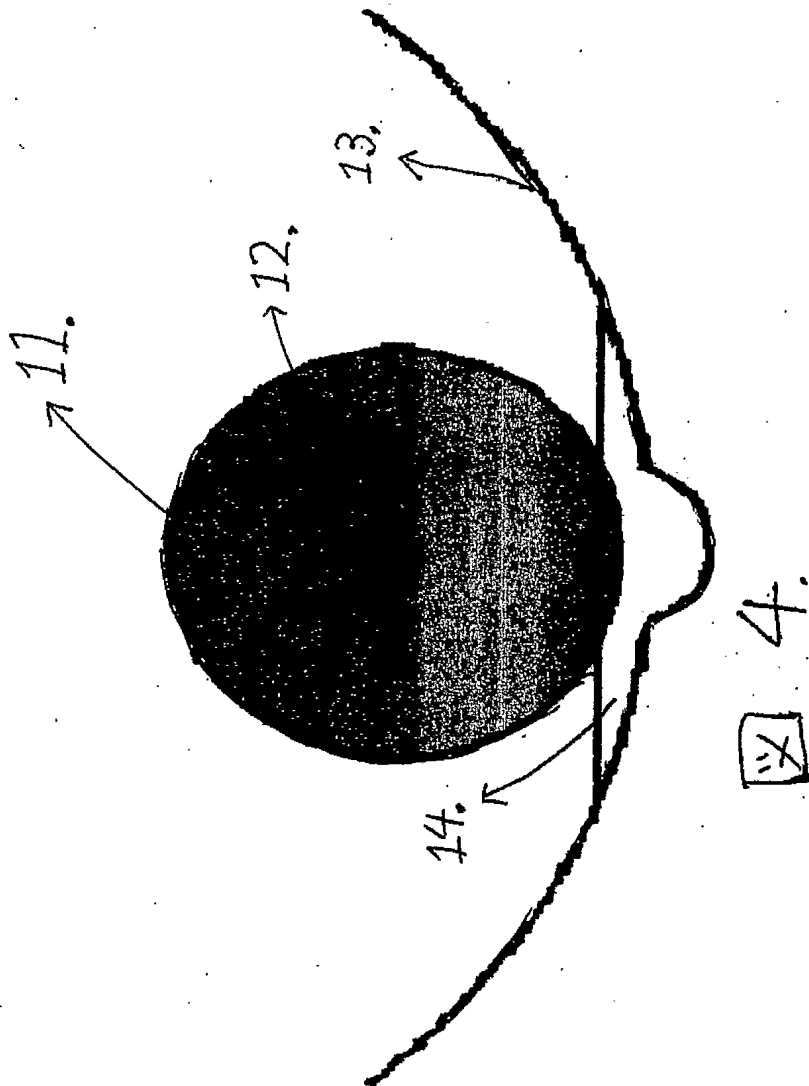
【図 2】



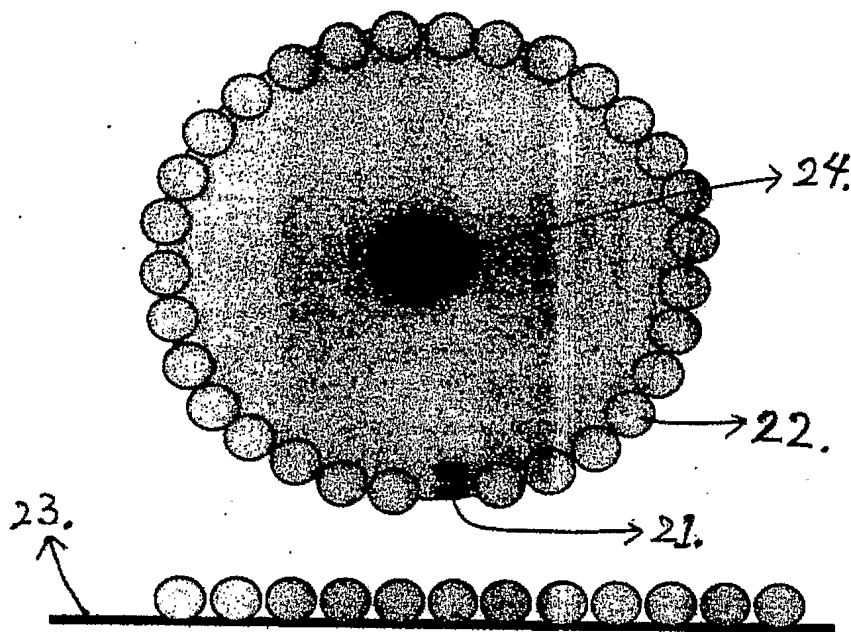
【図 3】



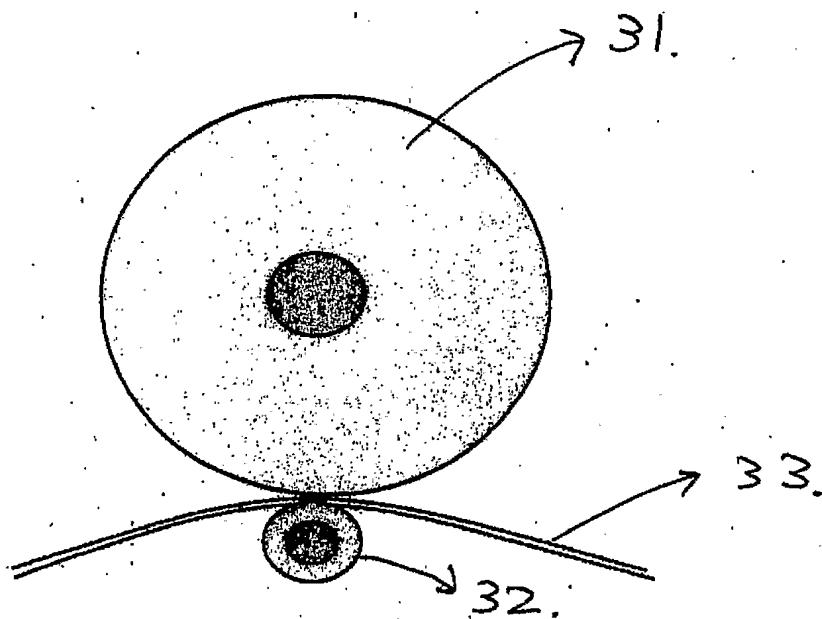
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 大量かつ安価に生産可能であり、計測解析においても高性能でハイスループットな生物学的チップシステムを提供することを課題とした。また、省経費と省資源の観点から、生物学的チップによるあらたな血液検査システムを創出することをさらなる課題とした。

【解決手段】 円盤もしくは円筒型支持体の円周面上に核酸、ペプチド、糖類、脂質、各種化学物質またはその断片からなるプローブを固定配置したことを特徴とする生物学的チップを構成し、この円盤もしくは円筒の回転により、円周面上に配列された複数のプローブ群から得られる計測情報を大量迅速に取り込むことにした。また、円盤もしくは円筒を数多くの薄板としたり、複数の薄板を積層することにより、大量のチップあるいは大容量チップを一括生産することにした。血液検査にはチップ上に孵卵槽を並べた生物学的チップを構成することにより、システムの簡略化と小型化、省資源を実現することにした。

【選択図】 図 1

認定：付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 4 3 6 5 1 1
受付番号	2 0 3 0 2 3 5 0 1 6 7
書類名	特許願
担当官	岩谷 貴志郎 7 7 4 6
作成日	平成 1 6 年 6 月 1 7 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】	申請人
【識別番号】	501022930
【住所又は居所】	愛知県日進市箕の手 2 - 1 5 7 8
【氏名又は名称】	株式会社モレニアムラボラトリーズ

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成16年 3月16日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2003-436511
【補正をする者】
 【識別番号】 501022930
 【氏名又は名称】 有限会社モレニウムラボラトリーズ
 【代表者】 中島 壽一郎
【発送番号】 018465
【手続補正1】
 【補正対象書類名】 特許願
 【補正対象項目名】 特許出願人
 【補正方法】 変更
 【補正の内容】
 【特許出願人】
 【識別番号】 501022930
 【住所又は居所】 愛知県日進市赤池町箕の手2丁目1578番地
 【氏名又は名称】 有限会社モレニウムラボラトリーズ
 【代表者】 中島 壽一郎

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 4 3 6 5 1 1
受付番号	2 0 4 0 0 6 4 0 5 0 3
書類名	手続補正書
担当官	岩谷 貴志郎 7 7 4 6
作成日	平成 1 6 年 6 月 1 7 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成16年 4月 3日
【補正をする者】	申請人
【識別番号】	501022930
【住所又は居所】	愛知県日進市箕の手 2 - 1 5 7 8
【氏名又は名称】	株式会社モレニアムラボラトリーズ

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成16年 5月 6日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-436511
【補正をする者】
【識別番号】 501022930
【氏名又は名称】 株式会社モレニウムラボラトリーズ
【代表者】 小出 寿子
【発送番号】 018465
【手続補正1】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 特許出願人
【補正方法】 変更
【補正の内容】
【特許出願人】
【識別番号】 501022930
【住所又は居所】 愛知県日進市赤池町箕の手2丁目1578番地
【氏名又は名称】 有限会社モレニウムラボラトリーズ
【代表者】 中島 壽一郎

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-436511
受付番号	20400890187
書類名	手続補正書
担当官	岩谷 貴志郎 7746
作成日	平成16年 6月29日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成16年 5月12日
【補正をする者】	申請人
【識別番号】	501022930
【住所又は居所】	愛知県日進市箕の手 2-1578
【氏名又は名称】	株式会社モレニウムラボラトリーズ

特願 2 0 0 3 - 4 3 6 5 1 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 1 0 2 2 9 3 0]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 1 月 1 8 日
 [変更理由] 新規登録
 住 所 愛知県日進市赤池町箕の手 2 丁目 1 5 7 8 番地 箕の手ハイッ
 B 棟 1 0 2 号
 氏 名 有限会社モレニウムラボラトリーズ
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 3 月 1 9 日
 [変更理由] 名称変更
 住 所 愛知県日進市赤池町箕の手 2 丁目 1 5 7 8 番地 箕の手ハイッ
 B 棟 1 0 2 号
 氏 名 株式会社モレニウムラボラトリーズ
3. 変更年月日 2 0 0 4 年 3 月 1 9 日
 [変更理由] 住所変更
 住 所 愛知県日進市箕の手 2 - 1 5 7 8
 氏 名 株式会社モレニウムラボラトリーズ
4. 変更年月日 2 0 0 5 年 1 月 2 1 日
 [変更理由] 住所変更
 住 所 愛知県日進市赤池町箕の手 2 - 1 5 7 8
 氏 名 株式会社モレニウムラボラトリーズ